

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Armin Prasch et al.

Application No.: 10/089,663

Confirmation No.: 6944

Filed: July 10, 2002

Art Unit: 1618

For: **BIODEGRADABLE EXCIPIENT SYSTEMS** Examiner: H. S. Ahmed
FOR THERAPEUTICALLY ACTIVE
SUBSTANCES AND METHOD FOR
PRODUCING THE SAME

SUBMISSION OF VERIFIED ENGLISH TRANSLATION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicants submit herewith a copy of German language patent DE 198 49 589 and a certified translation thereof. Entry of the certified translation is requested.

Dated: December 17, 2007

Respectfully submitted,

By 

Mitchell Bernstein

Registration No.: 46,550
DARBY & DARBY P.C.
P.O. Box 770
Church Street Station
New York, New York 10008-0770
(212) 527-7700
(212) 527-7701 (Fax)
Attorneys/Agents For Applicant

VERIFICATION AND STATEMENT OF ACCURACY OF A TRANSLATION

I, the below named individual, hereby declare as follows:

My name and post office address are as stated below.

I am knowledgeable in the English Language and in the language of the attached foreign language document, Patentschrift DE 198 49 589 and I believe the attached English translation of this document is a true and complete translation thereof.

All statements made herein of my own knowledge are true and all statements made on information and belief are believed to be true; and further these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that willful false statements may jeopardize the validity of the above-identified patent application or any patent issued thereof.

Dated: March 14, 2007

Translator's name (PRINTED) WALTER J. HERZBERG

Translator's Signature Walt J. Hezby

Post Office Address: 5-21 ELIZABETH ST. FAIR LAWN NJ 07410



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 198 49 589 C 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
A 61 L 24/00

⑳ Aktenzeichen: 198 49 589.7-45
㉔ Anmeldetag: 27. 10. 1998
㉓ Offenlegungstag: -
㉕ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 15. 6. 2000

DE 198 49 589 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Glatt Process Technology GmbH, 79589 Binzen, DE

⑦④ Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

⑦② Erfinder:
Prasch, Armin, Dr., 79100 Freiburg, DE; Luy,
Bernhard, Dr., 79102 Freiburg, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
WO 97 44 015 A1

⑤④ Fibrin-Gewebekleber-Formulierung und Verfahren zu dessen Herstellung

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft eine Fibrin-Gewebe-
kleber-Formulierung, enthaltend Thrombin und Fibrino-
gen, wobei das Thrombin und Fibrinogen mit Faktor XIII
als Gemisch in rieselfähiger fester Granulatform vorliegt
und das Granulat durch Trocknung der Proteinlösungen
mittels Sprüh- und/oder Wirbelschichttrocknung erhalten
worden ist.

DE 198 49 589 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine geeignete Formulierung einer stabilen, pulverförmigen, möglichst staubfreien und dadurch gut rieselfähigen, festen Darreichungsform eines Fibrin-Gewebeklebers zum Einsatz bei der Blutstillung, Wundversorgung (-heilung), Gewebeklebung und Nahtsicherung bei äußeren und inneren chirurgischen Operationen am Menschen, wobei sich die Formulierung mittels eines Wirbelschichtverfahrens darstellen läßt.

Die Blutgerinnung läuft im gesunden Körper bei Tieren (Säugetiere) und beim Menschen natürlich in Form einer Co-Enzym/Enzym gesteuerten Kaskadenreaktion ab. Der Hauptvorgang besteht darin, daß das (in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und auch im Blut) lösliche Fibrinogen in das unlösliche Fibrin übergeführt wird. Hierfür ist das proteolytische Enzym Thrombin notwendig, das durch den Prothrombinaktivator, einem Gemisch aus dem Stuart-Prover-Faktor (Faktor X) und dem Proaccelerin (Faktor V) bei Anwesenheit von Calcium-Ionen aus dem inaktiven Prothrombin (Faktor II) gebildet wird. Das Thrombin spaltet das in der Regel als Monomer (zu 75%) mit einer Molmasse von 340.000 Dalton, als Dimer (zu 15%) und als Polymer (zu 10%) vorliegende Fibrinogen in Fibrin und bildet dadurch lange Molekülketten. Diese werden durch den fibrin-stabilisierenden Faktor XIII (und bei Anwesenheit von Calcium-Ionen) zu einem stabilen, quervernetzten Fibrinpolymer verknüpft. Für diese biochemische Reaktion ist das reibungslose Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren (Gerinnungsfaktoren) notwendig. Im gesunden Organismus liegen die benötigten Gerinnungsfaktoren in ausreichender Menge in einem labilen Gleichgewicht vor.

Störungen dieses Gleichgewichts können lebensgefährlich sein. Störungen des Gleichgewichts können neben dem erblichen Mangel von bereits einem Gerinnungsfaktor (z. B. Hämophilie), bei starken Geweblungen, bei großflächigen, diffusen Blutungen (Weichgeweblungen), die nicht durch einen mechanischen Verschluß größerer arterieller oder venöser Gefäße gehemmt werden können, oder durch antikoagulativ wirkende, therapeutisch verabreichte Medikamente zur Thrombembolieprophylaxe verursacht werden. Diese Störungen können durch sog. Fibrin-Gewebekleber, einem Gemisch aus Fibrinogen, Faktor XIII, Thrombin und Human-Albumin sowie Calciumchlorid, ausgeglichen werden, wodurch es zu einer lokalen Blutstillung kommt. Fibrin-Gewebekleber kommen deshalb bei vielen verschiedenen Einsatzgebieten zur Anwendung.

Bei tumorchirurgischen Eingriffen insbesondere in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie sowie im gesamten HNO-Bereich (z. B. Zungenkarzinom-Resektion) kommt es häufig zu schwer beherrschbaren diffusen Blutungen. Die üblicherweise häufig eingesetzte elektrochirurgische Blutstillung durch Elektrokoagulation hinterläßt nach der Koagulation ausgedehnte thermische Gewebenekrosen, die insbesondere in diesen Bereichen äußerst unerwünscht sind.

In der plastisch-ästhetischen Gesichts- und Halschirurgie ("face-lifting") ist die Blutstillung durch Fibrinkleber unverzichtbar, da die Elektrokoagulation wegen der anatomischen Nachbarschaft der Behandlungsstelle zum Verlauf des Gesichtsnerves eine Gefährdung des Gesichtsnerves darstellt und diesen schädigen kann.

Des weiteren ist in der Notfallbehandlung bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen eine Behandlung mit einem Fibrin-Gewebekleber bei nicht sistierenden Blutungen angezeigt. Dies gilt auch bei Patienten, die wegen eines bestimmten Grundleidens antikoagulativ medikamentös behandelt werden (z. B. Therapie zur Embolieprophylaxe durch Heparine) und trotz des damit verbundenen Risikos

der gehemmten Blutgerinnung (verlängerte Blutgerinnung, Thrombozytenfunktionshemmung) operiert werden müssen. In diesem Fall sind deshalb durch die lokale Anwendung eines Fibrin-Gewebeklebers Maßnahmen zu ergreifen, die eine Blutstillung gewährleisten und postoperative Blutungen vermeiden. Dies kann z. B. auch bei Operationen an inneren Organen (z. B. Leber, Milz) erforderlich werden. Der Gewebekleber kann dabei über einen Doppelkatheter von außen endoskopisch zugeführt werden.

Weiterhin ist der Einsatz eines Fibrin-Gewebeklebers bei der Notfallversorgung großflächiger Wunden durch Verbrennungen dritten Grades sowie bei großflächigen Schürfwunden angezeigt.

Bei der Darreichung und Anwendung eines Fibrin-Gewebeklebers ist darauf zu achten, daß Fibrinogen und Thrombin erst direkt am Ort der Blutung (d. h. "in der Wunde") zusammengebracht werden, da die einsetzende Gerinnung spontan bei Anwesenheit der Wundflüssigkeit einsetzt. Benachbarte Stellen sind dabei gut abzudecken. Voraussetzung für die Gerinnung ist die freie Beweglichkeit der einzelnen beteiligten Moleküle z. B. in Wasser. Praktisch realisiert wird dies dadurch, daß z. B. die vier verschiedenen Komponenten (Fibrinogen-Faktor XIII-Konzentrat, Lösung für Fibrinogen, Thrombin-Konzentrat, Calcium-Chlorid-Lösung für Thrombin) vor der Anwendung getrennt aufbewahrt werden und erst direkt an der Wunde in gegenseitigen Kontakt gebracht werden. Die Komponenten müssen jeweils steril verpackt werden und in einer geeigneten Form und unter definierten Bedingungen aufbewahrt werden, so daß die Aktivität der einzelnen Proteine bzw. Enzyme durch die Lagerung nicht geschädigt wird. In der Regel wird dies so gelöst, daß die Proteinkonzentrate in gefriergetrockneter Form in kleinen Behältnissen vorliegen. In dieser Form sind sie bei Kühlbedingungen (4 bis 8°C) für eine bestimmte Zeit und für eine kürzere Zeit auch bei Raumbedingungen (20°C) lagerstabil. Gefriergetrocknet liegt das Konzentrat jedoch in fester, komprimierter und dadurch unbeweglicher Form, jedoch als löslicher Feststoff vor. Deshalb müssen die Proteinkonzentrate vor der Anwendung wieder vollständig in Lösung gebracht werden, um die gewünschte biochemische Reaktion starten zu können (Fig. 1). Dies darf jedoch erst direkt an der Wunde erfolgen, so daß die Lösungen jeweils vorher getrennt voneinander vorbereitet werden müssen. Vor der Anwendung des Fibrin-Gewebeklebers sollte dann die Wunde möglichst trocken sein, was bei großflächigen, diffusen Blutungen teilweise nur schwer erreichbar ist, um eine gute Fixierung des Gewebeklebers an Ort und Stelle zu ermöglichen. Die beiden Lösungen können jeweils über Injektionsspritzen z. B. im gleichen Volumenverhältnis zugegeben werden. Dabei ist die Fibrinogen-Lösung zuerst auf die Wunde aufzubringen und möglichst sofort mit der Thrombin-Lösung zu überschichten. Die zu klebenden Teile sind dann so lange zu fixieren, bis eine vorläufige Verfestigung eingetreten ist. Alternativ dazu gibt es mechanische Hilfen, z. B. in Form einer Doppelkammer-Injektionspritze, über die beide Lösungen gleichzeitig auf die Wunde aufgetragen werden können. Weitere technische Hilfsmittel sind z. B. Spray-Tip-Systeme bei großflächigen Wunden, Doppelballonkatheter in der Urologie oder Doppelkatheter zur endoskopischen Anwendung. Die Konzentration der Proteine in beiden Lösungen muß so eingestellt werden, daß Fibrinogen im deutlichen Überschuß gegenüber Thrombin vorliegt. Geeignete Verhältnisse sind gemäß dem Stand der Technik (z. B. 100 : 1) bekannt.

Dies macht deutlich, daß die Anwendung einerseits einer qualifizierten und konzentrierten Vorbereitung bedarf, die in Notfallsituationen teilweise nicht immer sichergestellt werden kann. Andererseits ist die Anwendung durch die um-

ständige und manuelle Handhabung des 2-Spritzen-Systems ebenfalls eingeschränkt.

Aus der WO 97/44015 sind lösliche Mikropartikel, die Thrombin und Fibrinogen enthalten, bekannt. Diese Mikropartikel werden mittels Sprühtrocknung hergestellt und besitzen eine Korngröße zwischen 1,5 und 10 µm. Nachteilig hierbei ist die ungenügende Handhabbarkeit dieses Pulvers.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, eine Fibrin-Gewebekleber-Formulierung anzugeben, die in der Handhabung einfach ist und über längere Zeit problemlos aufbewahrt werden kann, so daß die Einsatzmöglichkeiten einer derartigen Fibrin-Gewebekleber-Formulierung gegenüber dem Stand der Technik deutlich erweitert werden.

Aufgabe der Erfindung ist es gleichfalls ein entsprechendes Verfahren zur Herstellung einer derartigen Fibrin-Gewebekleber-Formulierung anzugeben.

Die Aufgabe wird in bezug auf die Formulierung durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 und in bezug auf das Verfahren durch die kennzeichnenden Merkmale des Patentanspruches 13 gelöst.

Die Unteransprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

Erfindungsgemäß wird somit vorgeschlagen, daß die Fibrin-Gewebekleber-Formulierung in fester rieselfähiger Form als Gemisch der verschiedenen Proteinkonzentrate vorliegt und somit problemlos in der Handhabung und in der Anwendung ist. Erfindungswesentlich ist dabei, daß die in der Formulierung enthaltenen Granulate durch Trocknung der Proteinlösung in einer Wirbelschichtapparatur hergestellt werden, da es sich überraschenderweise gezeigt hat, daß damit eine so schonende Trocknung der Proteinlösungen möglich ist, daß sich ihre funktionalen Eigenschaften nicht ändern. Der Korndurchmesser der Partikel beträgt 20 bis 500 µm. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, daß das Granulat in rieselfähiger Form vorliegt, so daß eine exakte Dosierung möglich ist.

Die Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach der Erfindung weist damit weitreichende Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf. Die Erfindung zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß

- das Gemisch (= der Fibrin-Gewebekleber) nicht reagiert (d. h. die Gerinnung auslöst), solange es in dieser festen Form vorliegt;

- das Gemisch (= der Fibrin-Gewebekleber) in fester und jedoch gleichzeitig pulver- bzw. granulatförmigen, dadurch rieselfähigen und staubfreien Form vorliegt, wodurch das Gemisch direkt auf die zu versorgende Wunde aufgetragen werden kann, ohne daß von der Anwendung die Protein-Komponenten (Fibrinogen-Faktor XIII-Konzentrat und Thrombin-Konzentrat) in Lösung gebracht werden müssen;

- das Gemisch (= der Fibrin-Gewebekleber) sich in der Wundflüssigkeit gut, vollständig und schnell löst;
- das Gemisch (= der Fibrin-Gewebekleber), nachdem bzw. während es sich in der Wundflüssigkeit gelöst hat bzw. löst, die biochemische Reaktion der Blutgerinnung auslöst und eine sich fixierende feste Schicht bildet und damit eine geeignete Wundversorgung darstellt;

- durch die Möglichkeit, die Partikelgröße vergleichsweise einfach variieren zu können, neue Anwendungsmöglichkeiten resultieren. Beispielsweise in der Form, daß es möglich wird, durch Variation der Partikelgröße bei der Dosierung den Wundkontakt entweder stark lokalisieren zu können (bei homogen verteilten, größeren Partikeln) oder auch großflächig in einer dünnen Pul-

verschicht (z. B. durch Spray-Systeme bei feinem Granulat) zu ermöglichen;

- sich im Gemisch als Granulatmischung unterschiedliche Mischungsverhältnisse beider Komponenten leicht einstellen lassen und so die Eigenschaften des Fibrin-Gewebeklebers (Löslichkeit, Einsetzen der Gerinnung) gezielt eingestellt werden können;

- durch die Tatsache, daß sich Pulver sehr homogen vermischen läßt, der "content uniformity" gut sicherstellen läßt, auch wenn ein breites Partikelgrößenspektrum vorliegt (d. h. das unabhängig von Partikeleigenschaften wie Korngröße Dichte, und andere immer das gewünschte Mischungsverhältnis besteht).

Die erfindungsgemäße Fibrin-Gewebekleber-Formulierung kann dabei so aufgebaut sein, daß entweder die einzelnen Proteinlösungen, d. h. die Fibrinogen-Faktor XIII-Lösung und die Thrombinlösung separat getrocknet und dann die getrockneten Granulate gemischt werden, oder daß bei der Trocknung der Proteinlösung zuerst das Fibrinogen getrocknet und dann auf dieses so hergestellte Granulat das Thrombin aufgebracht wird. Auch ist ein Aufbau möglich, bei dem das Thrombin den Kern bildet.

Bei der Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach der Erfindung ist weiterhin hervorzuheben, daß diese je nach Anwendungsfall eingestellt werden kann. So kann in der Gewebekleber-Formulierung zum einen das Mischungsverhältnis von Fibrinogen zu Thrombin gezielt je nach Anwendungsfall ausgewählt werden, zum anderen ist auch eine Steuerung der Partikelgröße möglich.

Bei der Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 3, d. h. bei der Formulierung, bei der jeweils zuerst separate Granulate der jeweiligen Proteine hergestellt und diese dann vermischt werden, ist es auch möglich, daß das Granulat aus einem Kern, aus einem Trägermaterial und einer darauf aufgetragenen Proteinschicht besteht. Das Trägermaterial kann z. B. aus wasserlöslichen Zuckern und/oder Zuckeraustauschstoffen und/oder biologischen Transportsubstanzen bestehen. Beispiele sind Mannitol oder Serum-Albumin. Bevorzugterweise wird die Formulierung so hergestellt, daß die Partikelgröße des Granulates im Bereich von 40–200 µm liegt.

Fibrin-Gewebekleber-Formulierungen mit einem Kern, d. h. mit einem Trägermaterial sind auch bei den Mischgranulaten bevorzugt. In diesem Fall besteht dann das Granulat aus einem Kern, z. B. wieder aus Mannitol, auf dem dann eine Fibrinogenschicht aufgebracht ist, über der dann die Thrombinschicht angeordnet ist. Diese Mischgranulate haben demnach einen dreischichtigen Aufbau. Selbstverständlich ist es gemäß der vorliegenden Erfindung auch möglich, daß diese Mischgranulate ohne Kern hergestellt werden. Bei der Ausführungsform mit den Mischgranulaten ist es weiterhin bevorzugt, wenn zwischen der Fibrinogenschicht und der Thrombinschicht eine Sperrschicht angeordnet ist. Diese Sperrschicht muß zum einen die Fibrinogenschicht von der Thrombinschicht trennen und muß zum anderen aber auch gut wasserlöslich sein. Materialien für diese Sperrschicht müssen deshalb die beiden vorstehend genannten Kriterien erfüllen. Beispiele hierfür sind niedermolekulare Polyvinylpyrrolidone oder auch Cellulosederivate oder auch Kohlehydrate, z. B. Dextrosederivate.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der vorstehend beschriebenen Fibrin-Gewebekleber-Formulierung.

Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, die im Fibrin-Gewebekleber typischerweise vorkommenden Proteine in einer Wirbelschichtapparatur schonend zu trocknen und dadurch einen rieselfähigen, granulatförmigen Feststoff herzu-

stellen. Eine geeignete Vorrichtung hierfür ist in der DE 44 41 167 C1 beschrieben. Auf diesen Offenbarungsgesamt wird deshalb Bezug genommen.

Bevorzugt wird das Verfahren so ausgeführt, daß das Fluidisationsgas durch die Wirbelschichtkammer von unten nach oben geführt wird und die zu trocknende Flüssigkeit (Lösung oder Suspension) von oben, von unten oder auch seitlich (Rotor-Wirbelschicht) über ein Sprühsystem eingesprüht wird. Das Fluidisationsgas hat gleichzeitig die Aufgabe, in der Wirbelkammer vorliegendes Produkt zu verwirbeln, die zum Verdunsten der Sprühflüssigkeit (Wasser oder organisches Lösungsmittel) benötigte Wärme dem Sprühstrahl oder dem feuchten Produkt zuzuführen und gleichzeitig die verdunstete Flüssigkeitsmenge aufzunehmen und abzutransportieren. Der Austrag des getrockneten Produktes wird einerseits durch die Wahl einer geeigneten Fluidisationsgeschwindigkeit (kleiner als die rechnerisch und experimentell ermittelbare sog. Austragsgeschwindigkeit für das Produkt), andererseits auch durch einen im oberen Bereich der Wirbelkammer vorhandenen und regelmäßig abreinigbaren Produktrückhaltefilter oder auch durch einen anderen, aus dem Stand der Technik bekannten Produktabscheider (wie z. B. ein Zyklonabscheider) verhindert.

Vorgegangen werden kann dabei z. B. derart, daß in der Wirbelkammer das Trägermaterial vorgelegt wird auf das dann z. B. aus wäßriger Protein-Lösung die Lösung aufgesprüht wird. Die im Sprühkegel fein zerstäubten Flüssigkeitströpfchen treffen dabei auf das aufgewirbelte pulverige Trägermaterial und trocknen dort aufgrund der für Wirbelschichtverfahren idealen Wärme- und Stoffübergangsverhältnisse, die im wesentlichen eine Folge der sehr großen spezifischen Partikeloberflächen des verwirbelten Produktes sind. Auf dem Träger lagern sich dann die in der Sprühflüssigkeit vorhandenen Proteine als Feststoff infolge adsorptiver Kräfte an. Der Träger ist idealerweise so beschaffen, daß er einerseits inert gegenüber den Proteinen ist (d. h. es darf zu keiner Wechselwirkung mit dem Proteinstrukturen kommen, was die funktionellen Eigenschaften bleibend ändern würde) und daß gleichzeitig die Löslichkeit der Proteine in Wasser, Wundflüssigkeit oder physiologischer Kochsalzlösung eingeschränkt oder verhindert wird. In Frage kommen deshalb z. B. gut wasserlösliche Zucker (z. B. Mannitol) oder auch andere, gemäß dem Stand der Technik als gut wasserlösliche Trägerstoffe bekannte Substanzen. Diese müssen jedoch, aufgrund der sehr spezifischen Eigenschaften der Proteine, auf deren Eignung einzeln bewertet werden. Als Träger auch geeignet sind Substanzen, die bereits im biologischen System als Transportsysteme fungieren und die gleichzeitig deshalb eingesetzt werden können, da sie in den natürlichen, biologischen Systemen neben den gewünschten Proteinen des Fibrin-Gewebeklebers vorliegen. Als Beispiel kann hierfür Serum-Albumin humanen Ursprungs oder in rekombinanter Form genannt werden.

Während des Sprühens kommt es aufgrund der im Partikel langsam zunehmenden Produktfeuchte zur Ausbildung von Agglomeraten oder Granulaten und dadurch zu einer Zunahme der Partikelgröße. Um die gute Wasserlöslichkeit zu erhalten, kann es vorteilhaft sein, amorphe Granulatstrukturen mit den daraus folgenden großen spezifischen Oberflächen zu erzeugen. Geeignete Prozeßbedingungen (Variation des Sprühdrukkes, Sprühdrate, Produkttemperatur und Zulufttemperatur, Feststoff-Konzentration der eingesetzten Sprühlösung), um diese Strukturen definiert und reproduzierbar zu erzeugen, sind gemäß dem Stand der Technik von Wirbelschichtverfahren bekannt. Durch Zugabe gemäß dem Stand der Technik bekannter wasserlöslicher Bindemittel (z. B. Cellulose-Derivate) kann die Partikelgröße in der Größe und in der Korngrößenverteilung variiert werden

(Schäfer, T.: Worts, O.: Control of fluidized bed granulation. V. Factors affecting granule growth. Arch. Pharm. Chemie. Sci. Ed. 6, 1978, 69-82).

Mit der exakten Einstellung einer bestimmten Partikelgröße können die Forderungen "Rieselfähigkeit" (und damit auch Dosierbarkeit), "Löslichkeit", "Staubfreiheit" und "Mischbarkeit" gut eingestellt und auch bewußt variiert werden. So ist es vorteilhaft, durch eine möglichst feine und kleine Partikelgröße eine großflächige, feindisperse Anwendung des Fibrin-Gewebeklebers zu ermöglichen. Gleichzeitig kann durch größere Partikel mit enger Partikelgrößenverteilung eine lokal stark begrenzte, gezielte Dosierung des Fibrin-Gewebeklebers möglich werden. Ein weiterer Freiheitsgrad für die Anwendung eines festen, rieselfähigen Fibrin-Gewebeklebers kann z. B. die Löslichkeit des Granulats darstellen. Damit kann z. B. eine maximal schnelle Löslichkeit oder eine verzögerte Löslichkeit und eine damit auch verzögert oder langsamer einsetzende Gerinnung eingestellt werden. Diese langsame oder verzögerte Gerinnung kann z. B. bei plastisch-ästhetischen Gesichtsoptionen zusätzliche Möglichkeiten zur zusätzlichen Manipulation oder Änderung operativer Eingriffe schaffen. Die Löslichkeit läßt sich sowohl über die Partikelgröße, die Partikelstruktur und über zusätzliche Substanzen, die die inneren Bindungskräfte erhöhen oder erniedrigen, beeinflussen.

Bei der Wahl der Prozeßbedingungen muß weiterhin primär darauf geachtet werden, daß die relevanten Proteine nicht geschädigt werden (z. B. durch hohe Temperaturen). Geeignete Zulufttemperaturen liegen z. B. zwischen 15 und 100°C; für die Produkttemperatur bevorzugt jedoch kleiner 50 oder 37°C. Berücksichtigt werden muß dabei, daß eine mögliche Inaktivierung immer im Zusammenhang mit einer bestimmten Feuchte betrachtet werden muß, d. h. die Temperaturstabilität nimmt mit abnehmender Produktfeuchte im Feststoff zu, so daß gegen Ende der Trocknung auch höhere Temperaturen akzeptabel sein können.

Die Trocknung muß bis zu einer Restfeuchte erfolgen, die so klein ist, daß je nach den gewählten Lagerbedingungen keine Aktivitätsverluste beobachtet werden oder daß es bereits zu einem selbsttätigen Ablaufen der Gerinnung kommt. Geeignete Lagerbedingungen sind: Kühlung bei 4 bis 8°C oder Raumbedingungen (20°C). Das Granulat kann zusätzlich in einer schützenden Atmosphäre (z. B. Stickstoff oder Kohlendioxid) und z. B. unter Lichtausschluß eingeschlossen sein. Mögliche Restfeuchten können dann z. B. zwischen 0,1-5% Wassergehalt liegen.

Die Erfindung wird nachfolgend durch Beispiele und die Fig. 1 und 2 näher erläutert.

Fig. 1 zeigt schematisch das 2-Spritzenmodell,

Fig. 2 zeigt eine Wirbelschichtanlage zur Durchführung des Verfahrens.

Allgemeine Vorschriften zur Herstellung des Granulats:

(1) Auf vorgelegtes Mannitol (mit Partikelgröße 50-100 µm) wird das Fibrinogen-Konzentrat (zusammen mit dem Faktor XIII) aus wäßriger Lösung aufgesprüht. Das Verhältnis Trägermaterial zu Proteinmenge kann z. B. in einem Bereich von 1 : 1 bis 100 : 1 variiert werden und liegt bevorzugt in einem Bereich von 1 : 1 bis 10 : 1. Getrocknet wird bis zur geeigneten Restfeuchte, die Produkttemperatur überschreitet während des Sprühens und des anschließenden Nachrocknens die Temperatur von 35°C nicht.

(2) Anschließend wird auf gleiche Weise auf ebenfalls vorgelegtes Mannitol (mit Partikelgröße 50-100 µm) das Thrombin-Konzentrat aus wäßriger Lösung mit einer definierten Menge Calcium-Chlorid aufgesprüht. Da Thrombin im Fibrin-Gewebekleber mengenmäßig

den deutlich kleineren Anteil hat, liegt das Verhältnis Trägermaterial zu Proteinmenge für Thrombin z. B. in einem Bereich von 50 : 1 bis 1000 : 1 und bevorzugt im Bereich 50 : 1 bis 200 : 1. Im Anschluß an das Sprühen wird ebenfalls bis zu einer geeigneten Restfeuchte unter Einhaltung einer maximalen Produkttemperatur von 35°C getrocknet. Beide erhaltenen Granulate werden anschließend vermischt und können dann direkt als Mischung auf die Wunde aufgetragen werden. Das Mischungsverhältnis orientiert sich an dem, gemäß dem Stand der Technik vorgegebenen, Verhältnis von Fibrinogen zu Thrombin, wie dieses auch bei den bisher bekannten flüssigen Darreichungsformen eingestellt wird. Darüber hinaus sind jedoch auch andere Mischungsverhältnisse Fibrinogen-Granulat zu Thrombin-Granulat gut und leicht einstellbar (anders als bei Lösungen, wo sich die Volumenverhältnisse an der Löslichkeit orientieren müssen). Somit kann durch definierte, homogene Mischungen die Wirkung des Fibrin-Gewebeklebers hinsichtlich Einsetzen der Gerinnung, Beginn einer irreparablen Verfestigung oder auch Festigkeit des vollständig geronnenen Klebers einfach und gezielt beeinflußt werden.

Alternativ dazu kann auch gemäß folgendem Prozeßablauf ein Fibrin-Gewebekleber hergestellt werden:

(3) Durchführung der Trocknung von Fibrinogen wie unter (1) beschrieben (auf Trägermaterial).

(4) Auf das getrocknete Granulat wird Thrombin aus einer organischen Suspension (geeignet ist z. B. Isopropanol) zusammen mit Calcium-Chlorid aufgesprüht. Thrombin (und auch Fibrinogen) ist in Isopropanol stabil, wird chemisch dadurch nicht verändert, löst sich jedoch nicht in Isopropanol. Thrombin lagert sich somit auf das mit Fibrinogen beladene Granulat an. Durch die Abwesenheit von Wasser kommt es nicht zu einer vorzeitigen Gerinnung z. B. bereits auf dem Granulat während der Sprühgranulation. Das Mischgranulat, bestehend aus Träger, Fibrinogen-Faktor XIII und Thrombin, kann direkt auf der Wunde angewandt werden. Anteile Fibrinogen zu Thrombin entsprechen wieder dem aus dem Stand der Technik bekannten Verhältnis. Die Löslichkeit, und damit verbunden auch die Gerinnung, wird bei diesem Mischgranulat, insbesondere auch durch die Abwesenheit einer erheblichen Trägermaterialmenge, die sich bei der Anwendung nicht erst lösen muß, erhöht.

(5) Um ein direktes Aufsprühen von Thrombin-haltiger, wäßriger Lösung (+CaCl₂) auf vorgelegtes Fibrinogen-Granulat (hergestellt gemäß (1)) zu ermöglichen, kann als innere Barriere auf das Fibrinogen-Granulat z. B. eine gut wasserlösliche Sperrschicht als räumliche Trennung von Fibrinogen und Thrombin aufgebracht werden. Für diese Sperrschicht gilt, daß zum einen beide Wirkstoffe dadurch chemisch nicht verändert werden dürfen, daß die Sperrschicht gut wasserlöslich ist und daß sie eine wirksame Trennung von Fibrinogen und Thrombin während des Sprühens und Granulierens und auch in der endgültigen, lagerstabilen, festen, getrockneten Form darstellt. Dafür geeignet sind z. B. niedermolekulare, Polyvinylpyrrolidon- oder auch Cellulose-Derivat-Lösungen oder auch Kohlehydrate (z. B. Dextrose-Derivate). Für das so hergestellte Produkt ist die gleiche Charakteristik bezüglich Löslichkeit und Gerinnung zu erwarten wie für das gemäß (4) produzierte Granulat.

Daneben sind auch Prozeßvarianten ohne ein zusätzlich vorgelegtes Trägermaterial möglich:

(6) Durch Einsprühen aus wäßriger Fibrinogen-Lösung oder aus isopropanolischer (bzw. organischer) Suspension in eine leere Anlage werden in-situ Granulatkeime bzw. fein verteilte Partikel erzeugt, die als Starterkerne für eine weitere Granulation dienen können. Die dafür zu verwendende Anlage kann z. B. ein Sprühturm oder auch eine Wirbelschichtanlage mit ausreichend freier Flugstrecke für die versprühten Flüssigkeitströpfchen sein. Bei Einhaltung geeigneter Prozeßbedingungen können die versprühten Flüssigkeitströpfchen entsprechend den Verhältnissen eines Sprühtrockners (jedoch mit reduzierten Trocknungstemperaturen) in einer Wirbelschichtanlage getrocknet werden, bevor sie z. B. im noch feuchten Zustand die Behälterwand berühren und dort kleben bleiben. Diese so erzeugten feinen Partikel werden durch das Fluidisationsgas in Bewegung und in der Schwebe gehalten und kommen so mit dem Sprühnebel der weiterhin eingesprühten Flüssigkeit in Kontakt und beginnen dann zu granulieren. Auf diese Weise kann, insbesondere durch sehr vorsichtige Fahrweise des Prozesses während des Anfahrens des Prozesses, in der ursprünglich leeren Anlage ein definiertes Granulatwachstum generiert werden. Dies kann z. B. durch Zugabe bekannter Bindemittel unterstützt werden. Durch Kombination mit einem klassierenden Granulataustrag (z. B. über einen Zick-Zack-Sichter und klassierendem Luftstrom) besteht die Möglichkeit, Granulat mit einer definierten Partikelgröße in der Anlage zu erzeugen und den Prozeß sogar in einer kontinuierlichen oder quasi-kontinuierlichen Fahrweise zu betreiben.

(7) Auf das gemäß (6) erzeugte Fibrinogen-Konzentrat-Granulat kann direkt wie unter (4) oder (5) beschrieben, Thrombin mit oder ohne eine zusätzliche Sperr-(bzw. Coating-)schicht aufgebracht werden.

Gemäß dem Stand der Technik können bzw. müssen die Herstellungsvarianten (1)-(7) für den Fibrin-Gewebekleber mit geeigneten Verfahren zum Inaktivieren von Viren kombiniert werden. Dies kann entweder so erfolgen, daß die Proteinkonzentrate vor der Trocknung mit bekannten Inaktivierungs-Verfahren (z. B. Pasteurisieren oder Solvent/Detergent-Verfahren) behandelt werden, oder daß das getrocknete Granulat, wie aus DE 44 41 167 C1 bekannt, direkt in der Wirbelschicht gegen Ende oder nach der eigentlichen Sprühgranulation oder Trocknung derartig wärmebehandelt wird, daß die Viren entsprechend inaktiviert werden. Dieser Behandlungsschritt muß jedoch so durchgeführt werden, daß die funktionellen Eigenschaften der Proteine erhalten bleiben.

Fig. 1 zeigt die schematische Darstellung der erforderlichen Vorbereitung der verschiedenen Komponenten eines Fibrin-Gewebeklebers vor der Anwendung und Möglichkeiten zur Verabreichung nach dem Stand der Technik.

- 1 Fibrinogen-Faktor XIII-Konzentrat
- 2 Lösung (z. B. physiologische Kochsalzlösung)
- 3 Thrombin-Konzentrat
- 4 Calcium-Chlorid-Lösung

Die Komponenten 1-4 sind sterilverpackt. In der Regel werden die Lösungen aus den Komponenten 2 und 4 mittels Vakuum in die Flaschen 1 und 3 gebracht. Nachdem sich in den Behältnissen 1 und 3 eine vollständige Lösung (ohne Trübung) gebildet hat, können die Lösungen in Sterilspritzen (5) und (6) aufgezogen werden und an bzw. in einer Wunde zur Verabreichung kommen. Die eingesetzten Mengen lie-

gen typischerweise im ml-Bereich.

Fig. 2 zeigt eine mögliche Ausführungsform einer Wirbelschichtanlage zur Herstellung des Granulates.

1 Wirbelschichtanlage

2 Unterteil

3 Anpreßvorrichtung (z. B. Hydraulikzylinder)

4 Zuluftkanal

5 Materialbehälter

6 Anströmboden (Gasverteiler)

7 Filtergehäuse (Entspannungszone)

8 Abluftkanal

9 Sprühkanal mit Sprühdüse

10 Produktrückhaltefilter

11 Sprühpumpe

Mittels eines Fluidisationsgases wird Produkt, Pulver oder Granulat in einer Wirbelschichtanlage 1 verwirbelt. Das Fluidisationsgas wird dabei durch die Wirbelschichtanlage 1 von unten nach oben z. B. mittels eines nicht dargestellten Ventilators durchgeführt. Die Aufgabe des Fluidisationsgases ist somit die Verwirbelung des zu behandelnden Gutes, die konvektive Wärmezufuhr an das Produkt bzw. an einen Sprühnebel und der Abtransport der verdunsteten Flüssigkeitsmenge während der Trocknung. Der Einlaß des Fluidisationsgases erfolgt über den im Unterteil 2 angebrachten Zuluftkanal 4. Die gleichmäßige Gasverteilung über dem Querschnitt des Reaktionsraumes erfolgt über einen Anströmboden 6, der gleichzeitig den Materialbehälter 5 vom Unterteil 2 trennt. Im Filtergehäuse 7 sind im oberen Bereich technische Hilfsmittel (z. B. Produktrückhaltefilter) zur Rückhaltung von feinkörnigem Produkt angebracht, die sicherstellen, daß kein Produktaustrag in den ebenfalls im oberen Bereich der Wirbelschichtanlage angebrachten Abluftkanal 8 erfolgen kann. Flüssiges Produkt (Lösung oder Suspension) kann über einen Sprühkanal mit Sprühdüse 9 und mittels einer Sprühpumpe 11 aus einer nicht dargestellten Vorlage in die Wirbelschichtanlage 1 entweder von oben (mit durchgezogener Linie dargestellt) oder von unten (gestrichelt dargestellt), eingesprüht werden. Der dadurch entstehende Sprühkegel trifft entweder auf bereits im Materialbehälter 5 vorgelegtes Produkt und trocknet dort auf der daraus resultierenden Partikeloberfläche oder wird analog zu Sprühtrocknungsbedingungen im Reaktionsraum direkt getrocknet und bildet so Pulver bzw. feinverteiltes Granulat. Durch eine Messung der Produkttemperatur während des Wirbelschichtprozesses und einer darauf basierenden Prozeßsteuerung kann eine produktschonende Trocknung eingehalten werden. Die Temperatur des Fluidisationsgases ist dabei selbstverständlich nach dem zu behandelnden Gut ausgewählt und kann z. B. in einem Bereich von 15 bis 100°C liegen. Die resultierende Produkttemperatur ist niedriger und kann bevorzugt kleiner 50°C oder besser kleiner 37°C während der Trocknung bzw. Sprühgranulation gehalten werden.

Patentansprüche

1. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung enthaltend Thrombin und Fibrinogen, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Thrombin und Fibrinogen mit Faktor XIII als Gemisch in rieselfähiger fester Granulatform mit einem Korndurchmesser im Bereich von 20-500 µm vorliegt, wobei das Granulat durch Trocknung der Proteinlösungen in einer Wirbelschichtapparatur erhalten worden ist.
2. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Korndurchmesser des Granulats im Bereich von 40-200 µm liegt.
3. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch

1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Gemisch aus separat getrockneten Thrombin- und Fibrinogengranulaten besteht.

4. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Thrombin- und/oder Fibrinogengranulate einen Kern als Träger aufweisen.

5. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Träger ausgewählt ist aus wasserlöslichen Zuckern und/oder Zuckeraustauschstoffen und/oder biologischen Transportsubstanzen.

6. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Gemisch ein Mischgranulat ist, bei dem Thrombin die äußere Schicht und das Fibrinogen den inneren Kern bildet.

7. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Mischgranulat aus einem Kern als Träger einer darauf angeordneten Fibrinogenschicht und einer äußeren Schicht aus Thrombin besteht.

8. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen der Fibrinogen- und der äußeren Thrombinschicht eine Sperrschicht vorhanden ist.

9. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Sperrschicht aus niedermolekularem Polyvinylpyrrolidon oder Cellulosederivatlösungen oder Kohlehydratlösungen durch Trocknung dieser Lösungen hergestellt worden ist.

10. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verhältnis von Thrombin zu Fibrinogen mit Faktor XIII im Bereich von 1 : 10 bis 1 : 1000, bevorzugt von 1 : 50 bis 1 : 200 liegt.

11. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Thrombingranulate und/oder Fibrinogengranulate und/oder Mischgranulate mit einer äußeren Sperrschicht versehen sind.

12. Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Thrombin- und Fibrinogenproteine durch gentechnologische oder biotechnologische Verfahren rekombinant hergestellt worden sind.

13. Verfahren zur Herstellung einer Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proteinlösungen von Fibrinogen und Thrombin in eine Wirbelschichtkammer eingesprüht und mittels eines Fluidationsgases getrocknet werden, wobei die maximale Produkttemperatur 50°C nicht überschreitet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem ersten Schritt ein Fibrinogenkonzentrat aus wäßriger Lösung in die Wirbelschichtkammer eingesprüht und getrocknet sowie isoliert wird und daß dann in einem zweiten Schritt das Thrombinkonzentrat aus wäßriger Lösung in die Wirbelschichtkammer eingesprüht, getrocknet und isoliert wird und daß dann anschließend beide erhaltenen Granulate vermischt werden.

15. Verfahren zur Herstellung einer Fibrin-Gewebekleber-Formulierung nach Patentanspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem ersten Schritt ein Fibrinogenkonzentrat aus wäßriger Lösung in die Wirbelschichtkammer eingesprüht und getrocknet wird und daß dann auf dieses getrocknete Granulat Thrombin

aus einer organischen Suspension aufgesprüht wird.
16. Verfahren zur Herstellung einer Fibrin-Gewebe-
kleber-Formulierung nach mindestens einem der An-
sprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die
Proteinlösungen auf ein vorgelegtes Trägermaterial 5
aufgesprüht werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG.1

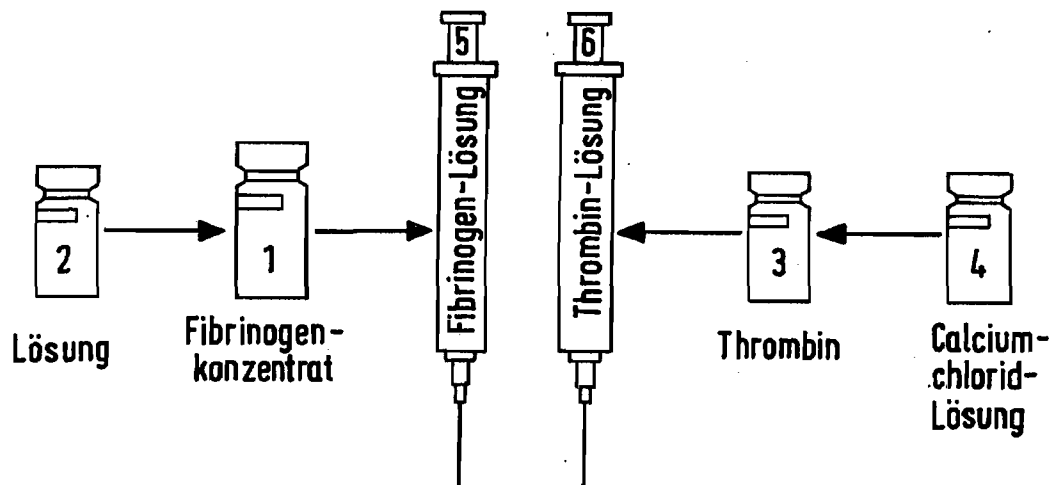
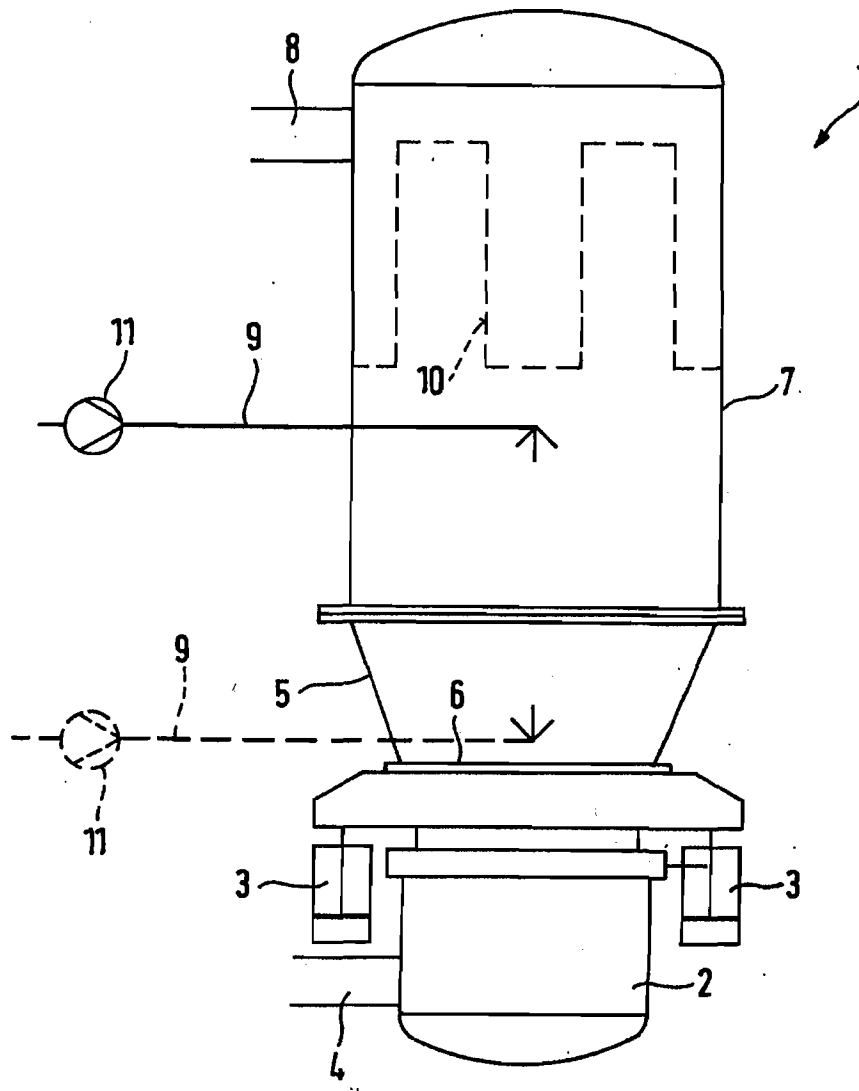


FIG. 2



{W:\03671\7001429-000\01031968.DOC [REDACTED] 1}

FIBRIN TISSUE ADHESIVE FORMULATION AND METHOD FOR PRODUCING THE FORMULATION

The invention relates to a suitable formulation of a stable, powdery, as far as possible dust-free and therefore readily flowable, solid form for administering a fibrin tissue adhesive for use in stopping bleeding, dressing (closing) wounds, gluing tissue and safeguarding sutures in the case of external and internal surgical operations in man, it being possible to prepare the formulation by means of a fluidized bed method or a spraying method or by a suitable combination of the two drying methods.

In the healthy body of animals (mammals) and in man, blood clotting takes place naturally in the form of a co-enzyme/enzyme-controlled cascade reaction. The main process consists therein that (in water, physiological salt solution and also in blood) soluble fibrinogen is transformed into the insoluble fibrin. For this purpose, the proteolytic enzyme, thrombin, is required, which is formed by the prothrombin activator, a mixture of Stuart-Prower factor (factor X) and the proaccelerin (factor V) in the presence of calcium ions from the inactive prothrombin (factor II). The thrombin splits the fibrinogen, which is usually present as a monomer (up to 75%) with a molecular weight of 340,000 Dalton, as a dimer (up to 15%) and as a polymer (up to 10%) and, by so doing, forms long molecular chains. These are linked by the fibrin-stabilizing factor XIII (and in the presence of calcium ions) into a stable, cross-linked fibrin polymer. The frictionless interplay of a series of factors (clotting factors) is necessary for this biochemical reaction. In the healthy organism, the clotting factors required are present in sufficient amounts in a labile equilibrium.

Disorders in this equilibrium may be life threatening. Aside from the deficiency of already one clotting factor (for example, hemophilia), disorders can be caused by heavy tissue bleeding, by diffuse bleeding over a large area (soft tissue

Furthermore, the use of a fibrin tissue adhesive is indicated for the emergency care of large-area wounds resulting from burns and of large-area abrasions.

When administering and using a fibrin tissue adhesive, it is necessary to take care that the fibrinogen and thrombin are brought together directly only at the site of the bleeding (that is, "in the wound"), since the clotting, which sets in, sets in spontaneously in the presence of wound fluid. At the same time, adjacent sites must be covered well. The free mobility of the individual, participating molecules, for example, in water, is a prerequisite for the clotting. This is realized practically owing to the fact that, for example, the four different components (fibrinogen factor XIII concentrate, solutions for fibrinogen, thrombin concentrate, calcium chloride solution for thrombin) are kept separately before use and are brought into mutual contact only directly at the wound. The components must each be packaged sterile and kept in a suitable form and under defined conditions, so that the activity of the individual proteins or enzymes is not affected by the storage. As a rule, this is accomplished by keeping the protein concentrates in a freeze-dried form in small containers. In this form, they have a certain shelf life under refrigerator conditions (4° to 8°C) and a shorter shelf life also at room temperature (20°C). When freeze-dried, the concentrate is present in a solid, compressed and therefore immobile yet soluble form. For this reason, the protein concentrates must be brought into solution completely once again before use, in order to be able to start the desired biochemical reaction (Figure 1). However, this may take place only directly at the wound, so that these solutions in each case must previously be prepared separately from one another. Before the fibrin tissue adhesive is used, the wound should be as dry as possible, in order to ensure that the tissue adhesive is fixed well at the site. This can be achieved only with difficulty in some cases when the bleeding is diffuse and extends over a large area. The two solutions can be added using injection syringes, for example, in the same ratio by volume. Moreover, the fibrinogen solution is to be applied on the wound first and

should be covered, as far as possible immediately, by the thrombin solution. The parts to be glued should then be fixed until a temporary fixation has set in. Alternatively, there are mechanical aids, for example, in the form of a double chamber injection syringe, by means of which the two solutions can be applied simultaneously on the wound. Further technical aids are, for example, spray-tip systems for wounds of a large area, double balloon catheters in urology or double catheters for endoscopic applications. The concentration of the proteins in the two solutions must be adjusted so that fibrinogen is present clearly in excess in comparison to the thrombin. Suitable ratios are known from the prior art (for example, 100:1).

This makes it clear that the use requires, on the one hand, a demanding and concentrated preparation, which cannot always be ensured in emergency situations. On the other hand, the use is also limited by the cumbersome and manual handling of the 2-syringe system.

It is therefore an object of the present invention to indicate a fibrin tissue adhesive formulation, which is easy to handle and can be kept for a longer time without problems, so that the possibilities of using such a fibrin tissue adhesive formulation are clearly expanded in comparison to the prior art.

It is likewise an object of the invention to indicate an appropriate method for producing such a fibrin tissue adhesive formulation.

In respect to the formulation, this objective is accomplished by the distinguishing characteristics of claim 1 and, in respect to the method, by the distinguishing characteristics of claim 14.

The dependent claims indicate advantageous further developments.

Pursuant to the invention, it is accordingly proposed that the fibrin tissue adhesive formulation be present in a solid, flowable form as a mixture of the different protein concentrates and can be handled and used without problems. In this connection, it is essential pursuant to the invention that the granulates, contained in the formulation, be prepared by drying the protein solution in a fluidized bed and/or a spray dryer, since, surprisingly, it has turned out that, with these methods, it is possible to dry the protein solutions so gently, that their functional properties are not changed. A further advantage can be seen therein that the granulate is present in a flowable form, so that it can be metered out accurately.

With that, the inventive fibrin tissue adhesive formulation has far-reaching advantages over that of the prior art. The invention is distinguished, in particular, owing to the fact that

- the mixture (= the fibrin tissue adhesive) does not react, that is, does not initiate clotting), as long as it is present in this solid form;
- the mixture (= the fibrin tissue adhesive) is present in solid form; at the same time, however, it is present in the form of a powder or a granulate and is therefore flowable and dust-free, as a result of which the mixture can be applied directly on the wound that is to be treated without having to dissolve the protein components (fibrinogen factor XIII concentrate and thrombin concentrate) prior to use;
- the mixture (= the fibrin tissue adhesive) dissolves well, completely and rapidly in the wound fluid;
- the mixture (= the fibrin tissue adhesive), after it has dissolved or while it is dissolving in the wound fluid, initiates the biochemical reaction of blood clotting and forms an immobilized, solid layer and, with that, represents a suitable wound dressing;
- due to the possibility of being able to vary the particle size comparatively easily, new application possibilities result, for example, in the form that it becomes

possible, by varying the particle size, either to localize the wound contact greatly during the dosing (in a case of homogeneously distributed larger particles) or also to make a thin layer of powder over a large area possible (for example, by spray systems using a fine granulate);

- as a granulate mixture, the two components can easily be mixed in different ratios, so that the properties of the fibrin tissue adhesive (solubility, onset of the clotting) can be adjusted selectively;
- owing to the fact that powders can be mixed very homogeneously, good content uniformity can be ensured, even if there is a broad spectrum of particle sizes (that is, that the desired mixing ratio always exists irrespective of the particle properties, such as particle size, density, etc.).

The inventive fibrin tissue adhesive formulation may be built up so that either the individual protein solutions, that is, the fibrinogen factor XIII solution or suspension and the thrombin solution are dried separately and the dried granulates are then mixed or that, during the drying of the protein solution, the fibrinogen is dried first and the thrombin is then applied on the granulate so prepared. A structure, in which the thrombin forms the core, is also possible.

It should furthermore be emphasized for the inventive fibrin tissue adhesive formulation that the latter can be adjusted depending on the application. On the one hand, the ratio, in which fibrinogen and thrombin are mixed, can be chosen selectively depending on the application and, on the other, it is also possible to control the particle size.

In the case of the fibrin tissue adhesive formulation of claim 2, for which separate granulates of the respective proteins are produced first and these are then mixed, it is also possible that the granulates consist of a core of a carrier material, on which the protein layer has been applied. The carrier material may consist, for example, of water-soluble sugars and/or sugar exchange materials and/or biological

transporting substances, of which mannitol or serum albumin is examples. Preferably, the formulation is prepared so that the particle size of the granulate ranges from 20 to 500 μm and preferably from 40 to 200 μm .

Fibrin tissue adhesive formulations with a core, that is, with a carrier material, are also preferred for the mixed granulate. In this case, the granulate then consists of a core, such as a mannitol core once again, on which then a fibrinogen layer is applied, over which then the thrombin layer is disposed. These mixed granulates accordingly have a three-layer construction. Of course, pursuant to the present invention, it is also possible to produce these mixed granulates without a core. For the embodiment with the mixed granulates, it is furthermore preferred that a barrier layer be disposed between the fibrinogen layer and the thrombin layer. On the one hand, this barrier layer must separate the fibrinogen layer from the thrombin layer and, on the other, also be readily soluble in water. Materials for this barrier layer must therefore fulfill both of the criteria named above. Examples of barrier layers are low molecular weight polyvinylpyrrolidones or also cellulose derivatives or carbohydrates, such as dextrose derivatives.

The invention furthermore relates to a method for producing the fibrin tissue adhesive formulation described above.

Pursuant to the invention, it is suggested that the proteins, which typically are present in fibrin tissue adhesives, be dried gently in a fluidized bed, a spray dryer or a suitable combination of these two drying variations or apparatuses, thereby producing a flowable, granulate-shaped solid. A suitable device for this is described in the DE 44 41 167, to the disclosed content of which reference is therefore made.

Preferably, the method is carried out so that the fluidization gas is passed through the fluidized bed chamber from the bottom to the top and the liquid to

be dried (solution or suspension) is sprayed in from above (top spray), from below (bottom spray) or also from the side (rotor fluidized bed) over a spraying system. At the same time, the fluidizing gas has the task of fluidizing the product present in the turbulence chamber, of supplying the heat for evaporating the spraying liquid (water or organic solvent) to the spraying jet or the moist product and, at the same time, of taking up the evaporated liquid and transporting it away. The discharge of the dried product is prevented, on the one hand, by selecting a suitable fluidizing speed (less so-called discharge velocity for the product, which can be determined by calculation or experiment) and, on the other hand, also by a product retention filter or also by a different product separator (such as a cyclone separator), which is known from the prior art and is present in the upper region of the turbulence chamber and can be cleaned regularly.

The procedure is such that the carrier material is added to the turbulence chamber and that the solution, such as the aqueous protein solution, is then sprayed onto this carrier material. The liquid droplets, finely atomized in the spraying cone, strike the fluidized, powdery carrier material and are dried there because of the heat transfer conditions and material transfer conditions, which are ideal for a fluidized bed method and which essentially are a consequence of the very large specific surface area of the particles of the fluidized product. The proteins, present in the spray liquid, are then deposited on the carrier in solid form as a consequence of absorptive forces. Ideally, the carrier is such that, on the one hand, it is inert to the proteins (that is, there must not be any interactions, which would change the functional properties permanently, with the protein structures) and, at the same time, that it does not limit or prevent the solubility of the proteins in water, wound fluid or physiological salt solutions. For this reason, sugars (such as mannitol) or also other substances, known as readily water-soluble carrier substances from the prior art, for example, come into consideration. However, because of the very specific properties of the proteins, the suitability of these carrier materials must be evaluated individually. Substances, which already function in biological systems as transporting

plastic, aesthetic facial operations, this slow or delayed clotting may offer additional possibilities for additional manipulations to or changes in the surgical intervention. The solubility can be affected by the particle size, the particle structure and by additional substances, which increase or decrease the internal binding forces.

Furthermore, when selecting the process conditions, care must be taken primarily, so that the relevant proteins are not damaged (for example, by high temperatures). Suitable temperatures of the air supplied range, for example, from 15° to 100°C. For the product temperature, however, they are lower than 50° or 37°C. In this connection, a possible inactivation must always be considered in connection with a particular moisture content, that is, the temperature stability increases as the moisture content in the solid product decreases, so that higher temperatures may also be acceptable toward the end of the drying.

The drying must be continued up to a residual moisture content, which is so low that, under the storage conditions selected, a loss of activity is not observed and there is no automatic clotting. Suitable storage conditions are cold storage at 4° to 8°C or storage at room temperature (20°C). In addition, the granulate may be enclosed in a protective atmosphere (for example, of nitrogen or carbon dioxide) with, for example, exclusion of light. Possible residual moisture contents can then, for example, be between 0.1 and 5%.

The invention is described in greater detail below by examples and Figures 1 and 2,

Figure 1 showing the two syringes modeled diagrammatically and
Figure 2 showing fluidized bed equipment for carrying out the method.

General Directions for Producing the Granulate:

- (1) The fibrinogen concentrate (together with the factor XIII) is sprayed from an aqueous solution onto mannitol already present (with a particle size of 50 to 100 μm). The quantitative ratio of carrier materials to protein may vary, for example, from 1 : 1 to 100 : 1 and preferably ranges from 1 : 1 to 10 : 1. Drying is carried out up to a suitable residual moisture content and the product temperature during the spraying and subsequent after-drying does not exceed a temperature of 35°C.
- (2) Subsequently, the thrombin concentrate is sprayed from an aqueous solution with a defined amount of calcium chloride in the same manner also on mannitol already present (with a particle size of 55 to 100 μm). Since thrombin is present quantitatively in the fibrin tissue adhesive in a much smaller proportion, the quantitative ratio of carrier material to protein for thrombin ranges, for example, from 50 : 1 to 1000 : 1 and preferably from 50 : 1 to 200 : 1. At the end of the spraying, drying is also carried out to a suitable residual moisture content, a maximum product temperature of 35°C not being exceeded. Subsequently, both granulates obtained are mixed and can then be applied directly as a mixture on the wound. The mixing ratio depends on the ratio of fibrinogen to thrombin, specified in the prior art and also used in the previously known liquid forms of administration. Moreover, however, other mixing ratios of fibrinogen granulate to thrombin granulate can also be set readily and easily (this is not the case with solutions, where the volume ratios must depend on the solubility). Accordingly, the onset of the clotting, the start of an irreparable solidification or also the strength of the completely clotted adhesive can be affected simply and selectively by defined, homogeneous mixtures.

Alternatively, a fibrin tissue adhesive can also be produced according to the following process:

- (3) The drying of fibrinogen is carried out (on carrier material) as described under (1).
- (4) Thrombin is sprayed from an organic suspension (isopropanol, for example, is suitable), together with calcium chloride onto the dried granulate. Thrombin (and also fibrinogen) is stable in isopropanol, is not changed chemically by the latter and does not dissolve in isopropanol. Thrombin is deposited accordingly on the fibrinogen-laden granulate. Due to the absence of water, there is no premature clotting, for example, already on the granulate during the spray granulation. The mixed granulate, consisting of carrier, fibrinogen, factor XIII and thrombin, can be used directly on the wound. The proportion of fibrinogen to thrombin corresponds once again to the ratio known from the prior art. The solubility, and, associated therewith, also the clotting is increased for this mixed granulate, especially also due to the presence of a considerable amount of carrier material, which does not first have to go into solution during use.
- (6) In order to make it possible to spray a thrombin-containing aqueous solution (plus calcium chloride) directly onto fibrinogen granulate already present (produced as in (1)), a barrier layer, readily soluble in water may be applied as an internal barrier on the fibrinogen granulate in order to separate the fibrinogen spatially from the thrombin. This barrier layer must not change, on the one hand, the two active ingredients chemically, must be readily soluble in water and must represent an effective means of separating fibrinogen from thrombin during the spraying and granulation, as well as in the final storage stable, solid, dried form. For example, low molecular weight polyvinylpyrrolidone solutions or also cellulose derivative solutions or also

- 2 lower part
- 3 pressure mechanism (such as a hydraulic cylinder)
- 4 inlet air channel
- 5 material container
- 6 air distributor plate (gas distributor)
- 7 filter housing (expansion zone)
- 8 outlet air channel
- 9 spraying channel with spray nozzle (top spray and bottom spray positions)
- 10 product retention filter
- 11 spray pump

The product, powder or granulate is agitated in a fluidized bed installation 1 by means of a fluidizing gas. For this purpose, the fluidizing gas is passed through the fluidized bed installation 1 from the bottom to the top, for example, by means of a fan, which is not shown. The task of the fluidizing gas accordingly is to agitate the material to be treated, to supply convective heat to the product and to a spray mist and to transport the evaporated liquid away during the drying. The fluidization gas is introduced over the inlet air channel 4, which is located in the lower part 2. The gas is distributed uniformly over the cross section of the reaction space by an air distributor plate 6, which, at the same time, separates the material container 5 from the lower part 2. In the upper region of the filter housing 7, technical aids (such as product retention filters) for retaining finely grained product) are mounted and ensure that the product cannot be discharged through the outlet air channel 8, which is also mounted in the upper region of the fluidized bed installation. Liquid product (solution or suspension) can be sprayed in over a spray channel with the spraying nozzle 9 and by means of a spray pump 11 from a receiver in the fluidized bed installation 1, which is not shown, either from above (top spray position, shown by a continuous line) or from below (bottom spray position, shown by a broken line). The therefrom resulting spray cone strikes either the product, which is already in the material container 5, and dries there on the therefrom resulting particle surface

or, analogous to spray drying conditions, is dried directly in the reaction space and thus forms a powder or a finely divided granulate. By measuring the product temperature during the fluidized bed process and using a process control, which is based on this measurement, it is possible to maintain product-protecting drying conditions. The temperature of the fluidizing gas is selected, of course, depending on the material to be treated and may range, for example, from 15° to 100°C. The resulting product temperature is lower and can be kept preferably below 50°C or, better yet, below 37°C during the drying or spray granulation.

Claims

1. Fibrin tissue adhesive formulation containing thrombin and fibrinogen, characterized in that the thrombin and fibrinogen with factor XIII are present as a mixture in flowable, solid, granulate form, the granulate being obtained by drying the protein solutions by means of spray drying and/or fluidized bed drying.
2. The fibrin tissue adhesive formulation of claim 1, characterized in that the mixture consists of separately dried thrombin and fibrinogen granulates.
3. The fibrin tissue adhesive formulation of one of the claims 1 or 2, characterized in that thrombin and/or fibrinogen granulates have a core as carrier.
4. The fibrin tissue adhesive formulation of claim 3, characterized in that the carrier is selected from water-soluble sugars and/or sugar exchange materials and/or biological transporting substances.
5. The fibrin tissue adhesive formulation of claim 1, characterized in that the mixture is a mixed granulate, in which the thrombin forms the outer layer and the fibrinogen the inner core.
6. The fibrin tissue adhesive formulation of claim 5, characterized in that the mixed granulate consists of a core as carrier of a fibrinogen layer disposed thereon and of an outer layer of thrombin.
7. The fibrin tissue adhesive formulation of claims 5 or 6, characterized in that a barrier layer is present between the fibrinogen layer and the outer thrombin layer.

8. The fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 5 to 7, characterized in that the barrier layer is prepared from low molecular weight polyvinylpyrrolidone or cellulose derivative solutions or carbohydrate solutions by drying these solutions.

9. The fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 1 to 8, characterized in that the ratio of thrombin to fibrinogen with factor XIII ranges from 1 : 10 to 1 : 1000 and preferably from 1 : 50 to 1 : 200.

10. The fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 1 to 9, characterized in that the particle diameter of the granulate ranges from 20 to 500 μm .

11. The fibrin tissue adhesive formulation of 10, characterized in that the particle diameter of the granulate ranges from 40 to 200 μm .

12. The fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 1 to 11, characterized in that the thrombin granulates and/or fibrinogen granulates and/or mixed granulates are provided with an external barrier layer.

13. The fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 1 to 12, characterized in that the thrombin and fibrinogen proteins are produced by a recombinant process involving a genetic engineering or by a biotechnology method.

14. Method for the preparation of a fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 1 to 14, characterized in that the protein solutions of fibrinogen and thrombin are sprayed into a fluidized bed chamber and dried by means of a fluidizing gas, the maximum product temperature not exceeding 50°C.

15. The method of claim 13, characterized in that, in a first step, a fibrinogen concentrate is sprayed from an aqueous solution into the fluidized bed chamber and dried as well as isolated and that then, in a second step, the thrombin concentrate is sprayed from an aqueous solution into the fluidized bed chamber, dried and isolated and that the two granulates obtained are then subsequently mixed.

16. The method for producing a fibrin tissue adhesive formulation of claim 14, characterized in that, in a first step, a fibrinogen concentrate is sprayed from an aqueous solution into the fluidized bed chamber and dried and that then thrombin is then sprayed from an organic suspension onto this dried granulate.

18. The method for producing a fibrin tissue adhesive formulation of at least one of the claims 14 to 16, characterized in that the protein solutions are sprayed onto a carrier material that is already present.